MW 36

# Untersuchungen über den oxydativen Abbau von Alkanen durch Nocardia petroleophila

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gerhard Seeler
aus Hamburg

Hamburg
1961

# Untersuchungen über den oxydativen Abbau von Alkanen durch Nocardia petroleophila

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Gerhard Seeler
aus Hamburg

Hamburg
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

auf Antrag von Professor Dr. H. Engel

Hamburg, den 12.7.1961 Professor Dr. C. Kosswig
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS.


| | Seite |
|---|---|
| EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG | 1 |
| MATERIAL, METHODEN UND VORVERSUCHE | 2 |
| 1. Anzucht | 2 |
| 2. Zellmengenbestimmung | 4 |
| 3. Manometrie | 6 |
| 4. Extraktion und Kulturfiltrat | 6 |
| 5. Wasserdampfdestillation flüchtiger Carbonsäuren | 6 |
| 6. C-Bestimmung in trockener organischer Substanz | 8 |
| 7. C-Bestimmung in wässrig gelöster organischer Substanz | 9 |
| 8. Papierchromatographie | 1o |
| 9. Herstellung radiometrisch geeigneter $BaCO_3$-Präparate | 17 |
| 1o. Radiometrie und Radioautographie | 18 |
| HAUPTVERSUCHE UND ERGEBNISSE | 2o |
| 1. Manometrische Messungen | 2o |
| 2. Anzucht in Anwesenheit von Esso-Varsol | 24 |
| 3. Anzucht in Anwesenheit von Undecan-1-$C^{14}$ | 3o |
| 4. Anzucht in Anwesenheit von Decan-1-$C^{14}$ | 36 |
| 5. Anzucht in Anwesenheit von $C^{14}O_2$ und n-Undecan oder n-Decan | 4o |
| SCHLUSSBETRACHTUNG | 44 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 49 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 5o |

## EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.

Bei dem Bemühen, Bacillus oligocarbophilus Beijerinck u. v. Delden erneut zu isolieren, erhielten HIRSCH und ENGEL (1956) u.a. die Nocardia petroleophila n.sp. in mehreren Stämmen. Wie der Name andeutet, beschleunigen Petroleumdämpfe das Wachstum dieser Art auf rein mineralischer Nährlösung. Den Stoffwechsel dieses Organismus untersuchte HIRSCH (1958) dann näher. Er zeigte, dass bei Kultivierung auf anorganischer Nährlösung in der Luft enthaltene gasförmige Verbindungen als Energie- und C-Quellen dienen, dass ohne $CO_2$ kein Wachstum möglich ist und dieses assimiliert wird. Flüchtige gesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe ($C_9$-$C_{14}$) werden zur Energielieferung unter $O_2$-Aufnahme und geringer $CO_2$-Abgabe oxydiert. Der RQ-Wert dieser Alkane beträgt etwa o,1 - o,2. HIRSCH vermutete insbesondere auf Grund des letzten Befundes, dass die Kohlenwasserstoffe nur unvollständig, etwa bis zu Fettsäuren, abgebaut würden. Hier knüpft die vorliegende Arbeit an. Es wurde versucht, die Produkte der Alkan-Oxydation aufzufinden, um eventuell auf die Art des Abbaues rückschliessen zu können und die Frage ihrer möglichen Assimilation zu klären.

Tab.1. Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Nährlösungen.

| Bestandteile in g | I | III a | III b | III a | III b | IV a | IV b | V a | V b | VI | VII | VIII | IX |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ n. Sörensen | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | "Westerländer Natursole" (Meerwasser), 3,4 % Mineralgehalt (Zusammensetzung s. WATTENBERG 1939) auf das 10fache Volumen verdünnt mit aq. dest. | | 1 | 1 | 1 | 2 |
| $K_2HPO_4$ reinst trocken | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $NaNO_3$ p.a. | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | | | 1 | - | - | 1 |
| $(NH_4)_2SO_4$ p.a. | - | - | - | - | - | - | - | | | - | 0,5 | - | - |
| $NH_4NO_3$ p.a. | - | - | - | - | - | - | - | | | - | - | 1 | - |
| KCl p.a. | 0,5 | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $CaCl_2$ p.a. trocken | 0,1 | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $MgSO_4+7H_2O$ p.a. | 0,5 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | - | - | | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,1 |
| $FeSO_4+7H_2O$ p.a. | 0,1 | " | " | " | " | - | - | | | " | " | " | 0,01 |
| $MnSO_4+4H_2O$ p.a. | Spur | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $ZnSO_4+7H_2O$ p.a. | " | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $(NH_4)_6Mo_7O_2+4H_2O$ p.a. | " | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| $NH_4VO_3$ reinst | " | - | - | - | - | - | - | | | - | - | - | - |
| Mit Leitungswasser ad 1000 ml | + | + | + | + | + | + | + | | | + | + | + | + |
| Eingestellt auf pH | 7,00 | 7,00 | - | 7,00 | - | 7,00 | - | ≈6,9 | - | 7,20 | 7,20 | 7,20 | 7,00 |
| Niederschl. vorhanden | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| " abfiltriert | - | - | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Sterilisiert 120°C 20' | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Niederschl. abfiltr. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Sterilisiert 113°C 30' | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + |
| pH-Wert | 7,3 | 7,45 | 8,25 | 6,85 | 5,68 | 6,92 | 5,87 | ≈7,1 | ≈8 | 7,37 | 6,96 | 6,92 | 7,1 |
| Niederschl. vorhanden | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

## MATERIAL, METHODEN UND VORVERSUCHE.

### 1. Anzucht

Die Versuche wurden mit dem von HIRSCH und ENGEL (1956) isolierten und von HIRSCH (1958) untersuchten Stamm 78 durchgeführt. Die ersten Kulturen wurden auf der Nährlösung (NL) I bei 30°C herangezogen. Diese entsprach bis auf geringfügige Abweichungen der NL E von HIRSCH (1958). Die Erlenmeyer-Kolben wurden mit Wattestopfen oder Glasbechern verschlossen. Zur Wachstumsförderung befand sich im Thermostaten ein offenes Gefäß mit Esso-Varsol 145/200 (eine von HIRSCH 1958 verwendete, praktisch olefinfreie Petroleumfraktion). Für die Weiterverarbeitung der anzuziehenden Versuchskulturen war es notwendig, eine niederschlagsfreie, vereinfachte Nährlösung zu finden. Die Zusammensetzung der von mir geprüften Nährlösungen und ihre Behandlung zeigt schematisch Tab.1.

Ein Versuch mit simultaner Anzucht auf NL I, IIa und b, IIIa und b, IVa und b, Va und b (100 ml-Kolben mit Glasbecherverschluss und je 30 ml NL) zeigte visuell nach 14 Tagen in allen Kolben einen etwa gleichstarken Bewuchs. Nur auf NL IVb war er etwa und auf NL Va deutlich geringer als auf den anderen Nährlösungen. Einige Wochen später wiesen nur noch die Kolben mit NL Va einen geringeren Bewuchs auf. Alle anderen NL-Oberflächen waren

gut bewachsen. Der Versuch zeigte auch die besondere Bedürfnislosigkeit dieses Organismus: NL IV enthält keine absichtlich hinzugegebene N-Quelle (im Leitungswasser befinden sich höchstens Spuren von N). NL V ist nach WATTENBERG (1939) noch ärmer an geb. N, während P praktisch völlig fehlt. Dennoch wuchs Noc. petr. unter diesen Bedingungen. Ausserdem wiesen in einem Warburg-Versuch die Zell-Suspensionen ohne bewusst zugegebene N-Quelle gegenüber solchen mit $NaNO_3$ eine nur um 7 - 8 % verringerte Substratatmung unter Esso-Petroleum auf.

Zur Erprobung der niederschlagsfreien Nährlösungen wurde die Nocardia parallel in 3oo ml-Erlenmeyer-Kolben mit je 5o ml NL VI, VII und VIII herangezogen. Nach 2 Wochen war visuell kein merklicher Wachstumsunterschied festzustellen. Nach weiteren 14 Tagen schien der Zuwachs auf VI > VIII ≥ VII zu sein und wiederum 14 Tage später war die Bewuchsstärke deutlich auf VI > VIII > VII. Die pH-Werte (in gleicher Reihenfolge) betrugen 7,21, 6,48, 6,63 bei gleichen Verdunstungsverlusten. Nach einem Warburg-Versuch mit nitratfreier NL I und $CO_2$-Gegenwart von 23o h Laufzeit zeigten die mit $NaNO_3$ versehenen Zellsuspensionen einen pH-Wert von 7,2o, diejenigen mit $(NH4)_2SO_4$ einen von 6,7o. Auf Grund dieser Erfahrungen wurde NL IX zusammengestellt. Obwohl niederschlagsfrei, zeigten die

Filtrate auch viele Wochen alter Kulturen praktisch keine Änderung des pH-Wertes, und das Wachstum war mindestens so gut wie auf NL I.

Weitere Vorversuche dienten dem Zweck, durch emerse und submerse Belüftung die Ausbeute an Zellsubstand pro Kulturkolben zu erhöhen. Das Ergebnis war jedoch unbefriedigend. Bei submerser Kultivierung erfolgte ein Oberflächenwachstum erst Monate nach Einstellung der Belüftung; ein Hinweis auf veränderte physiologische Verhältnisse bei so herangezogenen Zellen. Der Aufwand stand in keinem rationellen Verhältnis zum Gewinn an Zellsubstanz. Die Anzucht für die Hauptversuche erfolgte somit auf NL IX in gewöhnlichen Kulturkolben ohne Belüftung.

Die Prüfung auf Reinheit der Kulturen und Zellsuspensionen erfolgte mikroskopisch und durch Abimpfen in Hefewasser-Pepton-Fleischextraktbouillon.

2. Zellmengenbestimmung

Es wurde die von SPRINGER und KLEE (1954) angewandte Methode der C-Bestimmung mittels Oxydation durch Chromschwefelsäure aufgegriffen und zweckentsprechend abgewandelt:

Nocardia-Suspension (erhalten durch Schütteln mit Glasperlen - s.S. 2o - oder durch Verreiben von angefeuchteter Trockensubstanz im Porzellanmörser) wurde in 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert, bei etwa 15oo x g 2o min zentrifugiert, dann dekantiert (falls Waschen notwendig: wieder in aq.dest. suspendiert und das Zentrifugieren wiederholt). Die Sedimente wurden in je 1,7o ml $K_2Cr_2O_7$ p.a. 12o g/l suspendiert, darauf je 2,5o ml $H_2SO_4$ 1,84 p.a. zugesetzt und sofort umgeschüttelt. Die Röhrchen wurden 3o min stehen gelassen, ihr Inhalt quantitativ in 25 ml-Meßkolben gespült, zur Marke mit aq.dest. aufgefüllt, im Wasserbad abgekühlt und endgültig aufgefüllt. Gelegentlich auftretende leichte Trübungen wurden durch Zentrifugieren beseitigt.

Die Extinktion der Lösungen wurde photometrisch bei 578 nm in 4 cm Schichtdicke gemessen. Die so erreichte Ausfärbung blieb mindestens 24 h völlig unverändert. Die Extinktion war der Zellenmenge (geprüft bis 7,3 mg Trockensubstanz) proportional; je 1 mg Trockengewicht entsprach einer Extinktion von o,o95. Bei Parallelen derselben Suspension betrug die maximale Abweichung vom Mittelwert $\pm$ 2,5 %, bei Parallelwerten verschiedener Nocardia-Suspensionen max. $\pm$ 5 %. Unter gleichen Bedingungen ergab o,7o mg Glucose eine Extinktion, die 1,oo mg Nocardia-Trockensubstanz entsprach. Der Trockensubstanz-Kohlenstoff lag also entweder durchschnittlich in einem

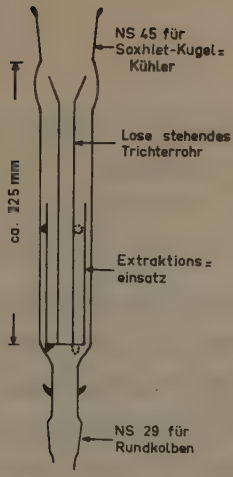


Abb. 1. Extraktor für kleinere Volumina

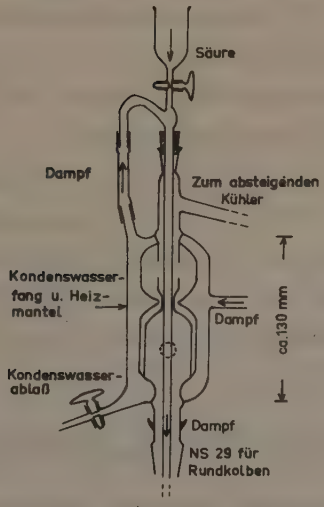


Abb. 2. Spritzerfang für Wasserdampfdestillationsapparat

stärker oxydierten Zustande vor oder seine Oxydation erfolgte konstant unvollständiger.

3. Manometrie

Die manometrischen Versuche wurden mit Differentialmanometern und Reaktionsgefäßen der Fa. Braun, Melsungen, durchgeführt. Die Wasserbadtemperatur betrug 30°C und die Schüttelfrequenz 110 Schwingungen/min. Die Dichtung der Schliffe erfolgte mit einem Paraffin-Vaseline-Gemisch.

4. Extraktion von Kulturfiltrat

Es wurde kontinuierlich mit peroxydfreiem Äther p.a. u. f.Chr. (Merck 921) extrahiert (vgl. RIECHE 1931). Zwei Apparate wurden benutzt:
1.) für Extraktionsräume von 0,5, 1 oder 2 l ein Kutscher-Steudel-Typ mit 250 ml-Verdampfungskolben,
2.) für Mengen bis 50 ml Extraktionsgut bewährte sich das Gerät der Abb. 1. Der zylindrische Einsatz konnte mit Trichterröhren verschiedenen Durchmessers versehen werden (KREBS, SMYTH and EVANS 1940), um auch bei kleinen Volumina eine grosse Schichthöhe zu erhalten. Die Temperatur des Wasserbades betrug ca. 48°C.

5. Wasserdampfdestillation flüchtiger Carbonsäuren

Die Apparatur hatte einen sehr wirkungsvollen Spritzerfang über dem Destillationskolben (vgl. McCLENDON 1944), und dem Dampfeinleitungsrohr war ein Kondenswasser-

fang vorgeschaltet (s.Abb. 2). Sie war ausserdem so konstruiert, dass Kolben unterschiedlicher Grösse angesetzt werden konnten, um Substanzverluste und unnötige Verdünnungen durch Umfüllen und Spülen zu vermeiden.

Ausführung:

Der Dampferzeuger wurde angeheizt, die Schlauchverbindung zum Dampfeinleitungsrohr abgetrennt, der 5o oder loo ml-Destillationskolben mit 5 - lo ml Destillans angeschlossen und der Schliff mit $H_3PO_4$ 1,7o p.a. gedichtet. Sobald dem Kondenswasserfang einige min lang kräftig Dampf entströmte, wurde durch den Tropftrichter am Dampfeinleitungsrohr o,5 - 1 ml $H_3PO_4$ 1,7o p.a. eingelassen und sofort die Schlauchverbindung wiederhergestellt. In die Vorlage kam ein Stückchen (einige loo mg) $NH_4$-Carbonat (Carbamat) p.a. Der Destillationskolben wurde über einem Asbestnetz so beheizt, dass das Flüssigkeitsvolumen in ihm ungefähr konstant blieb.

Bei der Erprobung wurden wiedergefunden in den ersten 9o ml Destillat von

| | | |
|---|---|---|
| 46o γ | Ameisensäure | 77 - 81 % |
| 6oo " | Essigsäure | 78 - 82 % |
| 24oo " | Essigsäure | 82 - 86 % |
| 72o " | Milchsäure | Ø |
| 36oo " | Milchsäure | etwa 1 %. |

Bei den in meinen Versuchen zu erwartenden Mengen wurden daher zur Abtrennung der niederen Fettsäuren von Milchsäure die ersten 6o - 9o ml Destillat aufgefangen.

## 6. C-Bestimmung in trockener organischer Substanz

Die Apparatur ähnelte dem bei CALVIN et al. (1949, S. 93) abgebildeten Gerät nach BARKER. Die Durchführung der Bestimmung entsprach den Angaben bei CALVIN et al. mit folgenden Abweichungen: In den Oxydationskolben wurden 10 ml Säuregemisch nach van Slyke-Folch ohne $KJO_3$ und in den Absorptionskolben unter $N_2$ 10 ml carbonatfreie, bei Zimmertemperatur gesättigte Barytlauge eingefüllt. Nach Beendigung der Oxydation wurde das Vakuum mit $N_2$ ausgeglichen und 5 ml heisse, siedend gesättigte $NH_4Cl$-Lösung zur Barytlauge gegeben. Das gefällte $BaCO_3$ wurde in einen Porzellanfiltertiegel überführt, mit wenig ausgekochtem aq.dest. gewaschen und bei 120°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei der Erprobung wurden folgende Mengen an C wiedergefunden:

| | |
|---|---|
| Na-Oxalat n. Sörensen | 95 - 100 % |
| Na-Acetat n. Reinitzer | 92 - 94 % |
| Glucose (Merck 8346) | 101 - 103 % |
| n-Capronsäure (Merck 197) | 100 % |
| n-Caprinsäure 99,5 % (Schu.) | 93 % |

Um die Herstellung der $BaCO_3$-Präparate mit "unendlich dicker Schicht" zur Messung der Radioaktivität zu ermöglichen (s.S. 17), wurden berechnete Mengen von Na-Oxalat n. Sörensen mit oxydiert.

## 7. C-Bestimmung in wässerig gelöster organischer Substanz

Es wurde die Apparatur von WEINHOUSE (s. CALVIN et al. 1949, S. 94 - 96) benutzt und folgendermaßen abgeändert. Der Erlenmeyer-Kolben wurde durch ein Gefäß ersetzt, das einem konischen Scheidetrichter glich. In diese Absorptionsbirne ragte das Einleitungsrohr tief in die Absorptionslösung, deren Schichthöhe durch die Lage der unteren Öffnung des Absorptionsrohres (mit den Glasperlen) festgelegt wurde. Zum Einschleusen von Lösungen in die Absorptionsbirne befand sich am Einleitungsrohr ein kleiner Tropftrichter, ein weiterer am Einleitungsrohr in den Oxydationskolben.

Ausführung:

Der Oxydationskolben wurde mit 2 g $K_2S_2O_8$ p.a. und 35 ml der Substanzlösung beschickt, umgeschwenkt, angeschlossen und die Apparatur durch Evakuieren in 15 min weitgehend von $CO_2$ befreit (vorgeschaltete Waschflasche mit 100 ml KOH 200 g/l). Unter $N_2$-Atmosphäre wurden zuerst 20 ml carbonatfreie Absorptionslösung (36 g $BaCl_2$ + $2H_2O$ p.a. + 36 g $Ba(OH)_2$ + $8H_2O$ p.a./l) + 0,5 - 1 ml Äthanol 96 %ig in die Absorptionsbirne und dann 1 ml $AgNO_3$ 80 g/l in den Oxydationskolben eingesogen. Dieser wurde im Wasserbad von 75°C 35 min lang erwärmt. Dann wurde das Wasserbad langsam zum Sieden gebracht und 5 min kochen gelassen.

Nach Entfernen des Bades wurde mit $N_2$ das Vakuum ausgeglichen und 5o ml heisse, ausgekochte $NH_4Cl$-Lösung 9o g/l in die Absorptionsbirne gespült. Nach Überführen des $BaCO_3$ in einen Porzellanfiltertiegel und ausreichendem Waschen mit wenig heissem aq.dest. wurde der Tiegel wie bei der vorstehenden C-Bestimmung getrocknet. Für 7o ml Substanzlösung wurden folgende Änderungen eingeführt: 4 g $K_2S_2O_8$, 2 ml $AgNO_3$-Lösung, Wasserbad: 7o min 75°C, dann wieder 5 min 75 → 1oo°C und 5 min 1oo°C.

Von der theoretischen Menge Kohlenstoff wurde bei der Prüfung der Methode wiedergefunden aus Na-Acetat n. Reinitzer 98 - 1oo % und n-Capronsäure (Merck 197) 1oo %. Um ausreichende Mengen Ba-Carbonat zur Herstellung von Meßpräparaten mit "unendlich dicker Schicht" nach den Angaben von S. 17 zu erhalten, wurden entsprechende Mengen Na-Acetat n. Reinitzer mit verbrannt.

## 8. Papierchromatographie

Zu Rate gezogen wurden die speziellen Artikel in HAIS und MACEK I (1958), PAECH und TRACEY I, II (1956, 1955), LINSKENS (1955, 1959), LEDERER und LEDERER (1953), CRAMER (1954) und weitere dort angeführte Originalliteratur. Chromatographiert wurde aufsteigend bei etwa 22°C mit Papieren der Fa. Schleicher & Schüll, Dassel, vornehmlich mit Viertelbögen von 28-29 x 29-3o cm. Folgende Sorten wurden verwendet: 2o4oa, 2o4ob Gl, 2o43b Mgl und

2043b ausgewaschen. Die Lösungsmittel und Reagentien hatten, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad: p.a. (z.T. "und für Chromatographie"). Bei eindimensionalen Chromatogrammen lief das Solvens parallel zur Faserrichtung.

Für jede Substanzgruppe wurden Lösungsmittelsysteme und Nachweisreagentien entwickelt, die unter den obigen Bedingungen Optimales leisteten. Die bei den Solventien in Klammern angeführten Verhältniszahlen bedeuten Volumenteile. Die Identifizierung erfolgte, ausser im normalen zweidimensionalen Chromatogramm, ausschliesslich durch Mitentwickeln authentischer Substanzen und Vergleich der $R_f$-Werte am selben Chromatogramm.

a) Fettalkohole ($C_1$ - $C_{10}$)

Auf Grund der Flüchtigkeit der niederen Homologen mussten diese Alkohole in Form von Derivaten chromatographiert werden. ~~Die~~ Substanzverluste mussten möglichst vermieden werden; deshalb erschienen die Xanthogenate wegen ihrer einfachen Darstellungsweise am geeignetsten.

Solvens: (A) Propanol : Butanol : KOH 20 g/l (5:5:1).
Nachweis: im UV-Licht braune Flecken.
Die Präparation authentischer Kaliumxanthogeante erfolgte mit Abänderungen nach den Angaben von KARYONE, HASHIMOTO und KIMURA (1951) sowie PAECH und TRACEY (1955, S.414).

Hergestellt wurden die K-Xanthogenate von Methanol, Äthanol, Butanol, Pentanol, Octanol und Decanol.

b) Fettalkohole ($C_8$ - $C_{12}$)

Die geringe Flüchtigkeit erlaubte ein direktes Auftragen. Wegen des lipophilen Charakters der höheren Alkohole wurde das Papier hydrophobisiert.

Papierimprägnierung: Esso-Varsol 145/200: Petroläther Kp. 40 - 70° (1:1).

Solvens: (B) Essigsäure 99-100 %ig : aq.dest. (6:4)

Nachweis mit Sprühreagens:

(α) 100 mg Rhodamin B (Merck) in 100 ml aq.dest.

c) Fettsäuren ($C_2$ - $C_{10}$)

Die Säuren wurden mit ammoniakalischen Solventien als $NH_4$-Salze getrennt.

Solventien: (C) Butanol : $NH_3$-Lösung 0,9l : aq.dest. (8:1:1);

(D) Pyridin : $CHCl_3$ : $NH_3$-Lösung 0,9l : aq.dest. (12:5:2:1);

(E) Pyridin : $CCl_4$ : $NH_3$-Lösung 0,9l : aq.dest. (13:4:2:2);

(F) Propanol : $NH_3$-Lösung 0,9l : aq.dest. (7:1:2).

Nachweis mit Sprühreagentien:

(ß) 50 mg Bromphenolblau + 100 mg Citronen-

säure n. Sörensen in 100 ml Äthanol 96 %ig;

(γ) 50 mg Bromkresolpurpur + 500 mg Na-Veronal in 10 ml aq.dest. gelöst, dann 90 ml Äthanol 96 %ig hinzugefügt;

(δ) 50 mg Bromthymolblau + 500 mg Na-Veronal in 10 ml aq.dest. gelöst, dann 90 ml Äthanol 96 %ig hinzugefügt;

(ε) 800 mg $AgNO_3$ in 8 ml $NH_3$-Lösung 0,91 gelöst, dann 100 ml Butanol hinzugefügt;

(ζ) 850 mg $AgNO_3$ in 100 ml $NH_3$-Lösung 6 %ig.

Formiat und Acetat konnten trotz vieler Versuche mit verschiedenen Solventien nicht getrennt werden. In den auch für die höheren Homologen optimalen Solventien (C und D) trennten sich nicht mehr Caprylat von Önanthat, Pelargonat von Caprylat und Caprat von Pelargonat, dagegen aber Pelargonat von Önanthat und Caprat von Caprylat. Von den geprüften nicht flüchtigen aliphatischen Carbonsäuren trennten sich nicht in (C): Lactat und Sebacat von Formiat + Acetat und in (D): Glykolat von Formiat + Acetat und Lactat von Propionat. In (D) besaß $NH_4NO_3$ etwa den gleichen $R_f$-Wert wie Önanthat und Caprylat, trat aber beim Besprühen mit (ß) nicht in Erscheinung (ebenso $NH_4Cl$, $NH_4$-Phosphat und $(NH_4)_2SO_4$). Durch Besprühen mit (ε) oder (ζ) und anschliessender Chromatogrammaufbewahrung im Dunkeln konnte Formiat (noch in Mengen von wenigen γ) neben Acetat und (oder) Glykolat erkannt werden; ausserdem mit grösserer Un-

sicherheit Glykolat neben Acetat und Lactat neben Acetat bezw. Propionat.

d) Fettsäuren ($C_1$ - $C_3$)

Wie vorstehend gesagt, gelang es nicht, Formiat und Acetat papierchromatographisch zu trennen, wohl aber konnte Formiat sicher nachgewiesen werden. Zum Erkennen gleichzeitig vorhandenen Acetats war somit doch eine Trennung notwendig. Von den hierzu geeigneten Derivaten, den Hydroxamaten und den Hydraziden, wurden die letzten verwendet, da es gelang, sie aus den $NH_4$-Salzen zu erhalten und damit Substanzverluste zu vermeiden.

Solventien: (D) s.S. 12

(G) Pentanol : Pyridin : aq.dest. (1o:2:1).

Nachweis mit Sprühreagentien:

(ε) oder (ζ), nach dem Besprühen etwa 1o min in einen Trockenschrank von ca. 7o°C, dann im Dunkeln aufbewahrt oder im photographischen Fixierbad fixiert.

Essigsäurehydrazid liess sich jedoch nicht ausreichend von Milchsäurehydrazid trennen. Zur sicheren Unterscheidung musste daher vor der Präparation auf Hydrazide die zu analysierende Substanz einer Wasserdampfdestillation unterworfen werden (s.S. 6). Authentische Säurehydrazide wurden unter Anlehnung an die Vorschriften von LEDERER und LEDERER (1953, S. 124) und HAIS und MACEK I (1958, S. 77o) hergestellt und durch Extraktion mit $CHCl_3$ iso-

liert. Dargestellt wurden so Ameisensäure-, Essigsäure-, Propionsäure- und Milchsäurehydrazid.

e) Fettsäuren ($C_{10}$ - $C_{18}$)

Diese stark lipophilen Säuren wurden mit "umgekehrten Phasen" chromatographiert.

Papierimprägnierung: Paraffinöl DAB 6 : Benzol (1:9).

Solvens: (H) Essigsäure 99-100 %ig : aq.dest. (9:1).

Nachweis: ($\eta$) s. HAIS und MACEK I (1958, S. 737): Bildung eines unlöslichen dunkelroten Komplexes aus der mit Kupfer verseiften Fettsäure.

f) Nichtflüchtige aliphatische Carbonsäuren

Folgende Säuren wurden als authentische Substanzen benutzt und auf dem zweidimensionalen Chromatogramm voneinander getrennt:

(cis-)trans-Aconitsäure,
Adipinsäure,
Äpfelsäure,
Bernsteinsäure,
Brenztraubensäure,
Citronensäure,
Fumarsäure,
Glykolsäure,
$\alpha$-Ketoglutarsäure,
Korksäure,
Maleinsäure,
Malonsäure,

Milchsäure,
Oxalsäure,
Sebacinsäure,
Weinsäure.

Alle von mir geprüften ammoniakalischen Solventien hinterliessen auf den normalen S & S-Chromatographiepapieren eine Auswaschungszone, die bei Substanzen mit hohem $R_f$-Wert den Nachweis störte. Sehr langfristige Versuche, die Papiere absteigend chromatographisch auszuwaschen, u.a. mit dem Solvens selber, waren nicht erfolgreich. Durch Verwendung der von der Lieferfirma ausgewaschenen Sorte 2o43b konnte hier Abhilfe geschaffen werden.

Solventien:

1. Richtung (// zur Faserrichtung): Äthanol 96 %ig (petrolätherverg&llt) : $NH_3$-Lösung o,91 : aq.dest.

(K) für 2o43b Mgl: (7:1:2),

(L) für 2o43b ausgew.: (15:2:3);

2. Richtung

(M) Pentanol : Ameisensäure 99%-loo %ig : aq. dest. (16:3:1).

Nachweis: wie bei den fettsauren $NH_4$-Salzen.

g) Aminosäuren

Es wurde zweidimensional nach REDFIELD (1953) chromatographiert. Versuche zur Verbesserung des Systems für die erste Richtung, um die Flecken von Arginin und

Lysin zu konzentrieren, waren erfolglos. In der ersten Richtung lief das Solvens senkrecht zur Faserrichtung.

Nachweis mit Sprühreagentien:

(♀) 25o mg Ninhydrin in 1oo ml Äthanol 96 %ig;

(♂) 4oo mg Ninhydrin in 11o ml Butanol + 1o g Phenol.

Die Darstellung der Aminosäuren aus Zellsubstanz erfolgte ähnlich wie bei NÄVEKE (1957). Die Trockensubstanz wurde vorher angefeuchtet und fein zerrieben.

## 9. Herstellung radiometrisch geeigneter $BaCO_3$-Präparate

Alle Glasgeräte wurden sorgfältig entfettet. Der Oberteil eines Filtergerätes 95v G 2 (Schott & Gen., Mainz) wurde gegen eines von 15o mm Länge mit Glashaken ausgetauscht. Auf die Filterplatte wurde ein Membranfilter Gruppe 6 (Membranfilter-GmbH, Göttingen) von 25 mm Ø gelegt, das vorher etwa 15 min in aq.dest. von 4o-6o°C gelegen hatte. Nach Dichtung des Ringspaltes durch Überziehen einer Gummimanschette wurde der Obermit dem Unterteil verbunden und das Ganze auf eine Saugflasche gesetzt.

Das $BaCO_3$ wurde in einem kleinen glattwandigen Porzellanmörser mit aq.dest. angefeuchtet, zu einem homogenen Brei verrieben und dann in ein Becherglas überführt. Die Suspension wurde in das vorbereitete Filtergerät bis

zur Höhe von etwa 140 mm eingegossen und abgesaugt. Das weitere Nachgiessen erfolgte unter Wahrung der Schichthöhe. Der Filterkuchen wurde nicht völlig trocken gesogen, um Rissebildung zu vermeiden. Das Filter mit der $BaCO_3$-Auflage wurde konzentrisch und luftblasenfrei mit Zelluloseleim (Tapetenkleister) auf ein uneloxiertes Al-Probenschälchen von 30 mm Ø geklebt. Die rissefreie Trocknung der Präparate erfolgte entweder über Nacht bei 35°C oder in kürzerer Zeit bei 120°C im Trockenschrank. Zur Kontrolle der Wasserfreiheit durften die Präparate nach dem wiederholten Einbringen in den Trockenschrank keine Erhöhung der Impulsausbeute zeigen.

## 10. Radiometrie und Radioautographie

Gemessen wurden relative (d.h. von der Meßanordnung abhängige) Radioaktivitäten von $C^{14}$ mit einem Methandurchflusszähler mit Endfenster (Frieseke & Höpfner, Erlangen-Bruck). Alle $BaCO_3$-Präparate wurden in "unendlich dicker Schicht" gemessen. Für Messungen auf Papierchromatogrammen wurden Al-Bleche untergelegt und der Methandurchflusszähler mit Endfenster direkt aufgesetzt oder Blenden aus Al-Blech zwischengelegt. Die Lokalisation der Flecken erfolgte durch vorheriges leichtes Besprühen mit dem betreffenden Reagens. Mindestens 1000 Imp wurden jeweils gemessen. Der Nulleffekt der Meßanordnung betrug unter Benutzung eines abgeschirmten

Handprobenwechslers knapp 14 Imp/min und auf den Chromatogrammen etwa 21 Imp/min. Falls erforderlich wurde der arithmetrische Mittelwert der gemessenen Effekte mit Koinzidenzkorrektur versehen und bei Messung in "dicker Schicht" mit dem Gesamtgewicht des $BaCO_3$ multipliziert. Dann wurde der Nulleffekt abgezogen.

Für radioautographische Untersuchungen wurde das trockene Papierchromatogramm zwischen papierbekleideten Hartfaserplatten z.T. beidseitig in direktem Kontakt mit Röntgenfilm Agfa SSS eingepresst. Die Exposition währte bis zu mehreren Monaten.

## HAUPTVERSUCHE UND ERGEBNISSE.

### 1. Manometrische Messungen

Diese Versuche wurden angestellt, um die von HIRSCH (1958) erhaltenen Befunde über den Gaswechsel der Nocardia zu sichern, da die von mir gewählten Bedingungen (Anzucht, Herstellung der Zellsuspensionen usw.) z.T. andere waren. Zur Herstellung der Zellsuspensionen wurden die Anzuchtkolben in eine sterilisierte Mensurnutsche (SEELER 1958) entleert, die NL abgesaugt und die Zellen mit frischer NL oder $KH_2PO_4$-Puffer o,ol Mol/l (pH 7,5) gewaschen. Nach dem Absaugen bis auf einige lo ml und Zugabe von sterilen Glasperlen wurde mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen und ca. lo min intensiv geschüttelt. Vor jedem Abpipettieren wurde aufgeschüttelt.

#### Versuch A:

Beschickung der Reaktionsgefässe:

Hauptraum: 3,oo ml Zellsuspension (=3,7 mg Trockensubstanz) aus 44 Tage bebrüteten Kulturen;

Seitenansatz: o,3o ml Carbonat-$CO_2$-Puffer 1 Mol/l (im Gleichgewicht mit $CO_2$-Partialdruck der normalen Luft);

Mitteleinsatz: o,3o ml Esso-Varsol 145/2oo bezw. aq.dest.ster.

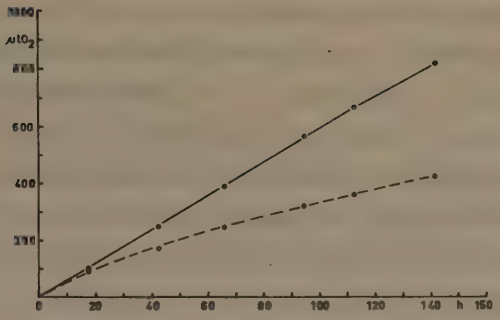


Abb. 3. Veratmung von Esso-Varsol 145/200 (-) und zugehörige Restatmung (--) im Versuch A (Mittelwert von je 3 Reaktionsgefäßen).

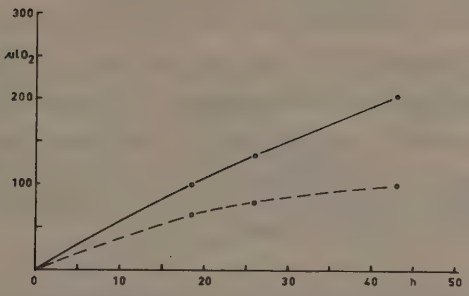


Abb. 4. Veratmung von Esso-Varsol 145/200 (-) und zugehörige Restatmung (--) im Versuch B (Mittelwert von je 3 Reaktionsgefäßen).

Wie die Abb. 3 erkennen lässt, wurde - wie in den Versuchen von HIRSCH - in Gegenwart von Substrat (= Esso-Varsol) mehr $O_2$ aufgenommen als in Abwesenheit. Flüchtige Bestandteile dieser Petroleumfraktion wurden also oxydativ angegriffen. Wie HIRSCH nachgewiesen hatte, handelt es sich dabei um gesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe. Wie das Kurvenbild weiter zeigt, erfolgte die $O_2$-Aufnahme in Gegenwart von Substrat fast linear und bei Abwesenheit leicht progressiv abnehmend. In anderen Versuchen war der $O_2$-Verbrauch in KW-Gegenwart sogar zunehmend. Bei Abbruch des Versuches war die Intensität der endogenen Atmung immer noch halb so gross wie die der Substratoxydation. Diese hohe Restatmung trat auch in den Versuchen von HIRSCH auf, aber auch die Substratatmung in $CO_2$-Anwesenheit zeigt bei seinen Versuchen meistens eine zunehmende leichte Abnahme des $O_2$-Verbrauches, während Linearität nur bei stark vermindertem $CO_2$-Partialdruck (KOH-Gegenwart) erhalten wurde. Hiervon abgesehen, bestätigen meine Versuche jedoch die Beobachtungen von HIRSCH über den Gasstoffwechsel der Nocardia unter Petroleumdampf.

Wurden im Anschluss an Warburg-Versuche dieser Art die Reaktionsgefässe über 13o h lang nicht geschüttelt, zeigte sich keinerlei emerse Zellentwicklung. Es ist zu vermuten, dass diese Zellsuspensionen gegenüber intakten (unzerschlagenen) Zellen z.T. abweichende

physiologische Verhältnisse aufweisen. Die relativ hohe endogene Atmung der Warburg-Suspensionen kann möglicherweise so erklärt werden.

Um den Nachweis von organischen Stoffwechselprodukten in der Nährlösung zu erleichtern, wurden Versuche folgender Art mit $C^{14}$-markiertem Bicarbonat angestellt.

Versuch B:

Beschickung der Reaktionsgefässe:

Hauptraum: 3,oo ml Zellsuspension (= 1,15 mg Trockensubstanz) aus 2o Tage bebrüteten Kulturen,
o,4o ml $NaHC^{14}O_3$-Lösung (112 mg/l mit 8,o3 mc);

Seitenansatz A: o,3o ml Carbonat-$CO_2$-Puffer wie bei Versuch A;

Seitenansatz B: o,3o ml 2N-$H_2SO_4$ p.a.

Mitteleinsatz: o,3o ml Esso-Varsol 145/2oo bezw. aq.dest.ster.

Bei Abbruch des Versuches wurde die Schwefelsäure in den Hauptraum gekippt und der Gasraum durch einen $CO_2$-freien Luftstrom von $CO_2$ befreit, das in Barytlauge ausgefällt wurde. Die Zellsuspensionen wurden auf Membranfilter gebracht (vgl. S. 17), mit aq.dest. gewaschen und die Filter nach dem Aufkleben in Probenschälchen über Nacht bei

Tab.2. $C^{14}$-Radioaktivität (Imp/min) der Zellen und des Suspensionsfiltrates nach Abbruch der manometrischen Messungen im Versuch B.

| | Substratatmung | Restatmung | Verhältnis der Aktivitäten |
|---|---|---|---|
| Zellen (Mittelwert der Trockensubstanz-Meßpräparate von je 3 Reaktionsgefäß.) | 1660 | 1200 | 1,4:1 |
| Suspensionsfiltrat (Mittelwert der $BaCO_3$-Meßpräparate von je 2 Reaktionsgefäßen) | 350 000 | 46 450 | 7,5:1 |

Zimmertemperatur getrocknet. Die Filtrate + Waschwasser wurden neutralisiert, zur C-Bestimmung aufgearbeitet (s.S. 9) und aus dem $BaCO_3$ Meßpräparate hergestellt (s.S. 17).

Abb. 4 zeigt den Verlauf der Substrat- bezw. Restatmung. Er entsprach dem des Versuches A, nur mit dem Unterschied, dass jetzt auch die Substratatmung mit leichter Abschwächung ihrer Intensität verlief. Wie die Impulsausbeute erkennen lässt, war die Oxydation der Kohlenwasserstoffe mit einem vermehrten $CO_2$-Einbau in die Zellen verbunden (s.Tab. 2). Allerdings war das Verhältnis der Radioaktivität der Zellen mit Substratatmung zu derjenigen der Zellen mit Restatmung mit 1,4:1 niedriger als in dem Versuch von HIRSCH. Wahrscheinlich war das z.T. eine Folge der hohen Intensität der Restatmung meiner Zellsuspensionen. Wie die Tab. 2 weiter zeigt, lagen auch hier in den Nährlösungen markierte organische Substanzen vor. Die Radioaktivität konnte nicht auf Bicarbonatreste beruhen, denn diese waren durch Ansäuern praktisch vollständig ausgetrieben worden. Das Verhältnis der $C^{14}$-Aktivität der beiden Filtratfraktionen betrug rund 8:1 und entsprach der von HIRSCH (1958) gemessenen Relation. Es wurden also unter Oxydation von Kohlenwasserstoffen und Einbau von $CO_2$ Stoffwechselprodukte im Medium angehäuft. Diese im Zuge des Kohlenwasserstoffabbaues stattfindende Ausscheidung organischer Stoffe in die Nährlösung war offensichtlich wesentlich stärker als der

Stoffeinbau in die Zellen, wie der Vergleich der beiden Quotienten zeigt (s.Tab. 2). Diese Ergebnisse liessen es aussichtsreich erscheinen, $C^{14}$ in Versuchen grösseren Maßstabes zur Lösung der gestellten Aufgabe heranzuziehen.

2. Anzucht in Anwesenheit von Esso-Varsol

Zunächst wurde geprüft, ob sich im Kulturfiltrat Verbindungen befanden, die zu dem untersuchten Problem in Beziehung gebracht werden konnten. Das langsame Wachstum von Nocardia petrolophila und die relativ geringe Zellkoloniedichte pro Oberflächeneinheit der Nährlösung zeigten einen niedrigen stoffwechselphysiologischen Umsatz an. Daher war nur mit sehr kleinen Mengen von Ausscheidungsprodukten im Kulturfiltrat zu rechnen. Um dennoch ausreichendes Material für die Analyse zu erlangen, wurden monatelang fortlaufend Kulturen wie folgt angezogen und verarbeitet:

Anzuchtbedingungen und Gewinnung der Kulturfiltrate:

3oo ml- bezw. 1 l-Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 5o bezw. loo ml NL IX beschickt und mit Glasbechern oder Augenwatte (chemisch rein) verschlossen. Einen Tag nach der Sterilisation wurden sie mit je einer Platinöse Nocardia-Kolonien aus den Stammkulturen mit NL IX beimpft und 3 bezw. 4 Wochen bei 3o°C in einen Brutschrank gestellt, in welchem ein offenes Gefäss mit Esso-Varsol

145/2oo stand. Die Trennung von Bewuchs und Kulturlösung wurde mit einem Coli 5-Gerät und einem ausgekochten Membranfilter Gruppe 6 (Membranfilter-GmbH, Göttingen) vorgenommen. Mit aq.dest. wurde nachgewaschen.

Prüfung auf Fettsäuren:

Das Filtrat wurde mit $H_2SO_4$ 1,84 p.a. auf pH 1-2 angesäuert, das entsprach ca. o,o5 Mol $H_2SO_4$ pro 1 Filtrat. Darauf wurde im Kutscher-Steudel-Apparat, wie Seite 6 beschrieben, rund 2o h pro 1 Filtrat mit Äther extrahiert. Der Extraktionsäther wurde mindestens 5 mal mit verd. $NH_3$-Lösung ($NH_3$-Lösung o,91 p.a. auf das Vierfache Volumen verdünnt) ausgeschüttelt. Um Substanzverluste zu vermeiden, wurde auf vorheriges Trocknen verzichtet, zumal $NO_3^-$ und $Cl^-$ wegen ihrer Ätherlöslichkeit nicht zu entfernen waren. Die vereinigten $NH_3$- Phasen wurden nach Zugabe von einigen loo mg $NH_4$-Carbonat (Carbamat) p.a. im Wasserstrahlpumpen-Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von max. 4o°C vorsichtig eingeengt. Durch Erprobung mit authentischen Substanzen war sichergestellt, dass sich auch die $NH_4$-Salze der niederen Fettsäuren im Rückstand wiederfanden. Der Inhalt einer zwischengeschalteten, wassergekühlten Falle mit einigen loo mg $NH_4$-Carbonat oder $NH_3$-Lösung wurde anschliessend ebenso eingeengt. Pro Liter Kulturfiltrat wurden etwa 13 mg einer hygroskopischen, orangegelben, z.T. kristallinen Substanz erhal-

ten, die für die papierchromatographischen Analysen in verd. $NH_3$-Lösung aufgenommen wurde.

Befund:

Durch kombinierte Entwicklung in den Systemen (C), (D), (E), (F) und (H) und Anwendung der Reagentien (ß) - (ξ) wurden die folgenden fettsauren Salze in den aufgetragenen Substanzen gefunden: Formiat und (oder) Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat, Caproat, Önanthat und (oder) Caprylat. Natürlich konnten mehr oder minder auch die verzweigten Isomeren vorliegen, da diese sich papierchromatographisch meist nicht von ihren Normalverbindungen trennen. Das angebotene Substrat Esso-Varsol stellt sehr überwiegend ein Gemisch einer grossen Anzahl von gesättigten aliphatischen Kohlenwasserstoffen dar. Somit war die Möglichkeit der Oxydation einer Iso-Verbindung durch die Nocardia nicht auszuschliessen. Von den aufgefundenen Fettsäuren lagen anscheinend Ameisen-, Essig- und Propionsäure in etwas grösserer Menge vor als die $C_4$-$C_8$-Säuren. Aber eine quantitative Beurteilung war kaum möglich; denn in den Chromatogrammflecken jener 3 Säuren konnten noch je nach angewandtem Solvens (von den geprüften Verbindungen) Glykolat, Lactat oder Sebacat vorhanden sein (s.S. 13).

Prüfung auf Essigsäure:

Da Formiat nachgewiesen worden war, musste auf Essigsäure gesondert geprüft werden (vgl. S. 14). Dazu wurden mit einem kleinen Teil der durch Extraktion gewonnenen Substanz Wasserdampfdestillationen ausgeführt, um die flüchtigen Fettsäuren von den weniger flüchtigen Säuren abzutrennen (s.S. 6). Die alkalisierten Destillate wurden in einem 5o oder loo ml-Rundkolben wie oben angegeben bis fast zur Trockene eingeengt. Ein kleiner Teil der in $NH_3$-Lösung aufgenommenen Rückstände wurde direkt mit (D) chromatographiert.

Befund: Formiat (+ Acetat ?).

Der andere Teil der Rückstände wurde mit loo bis 2oo µl Hydrazinhydrat loo %ig (Schuchardt) versetzt und analog den Angaben von Seite 14 behandelt. Die Epi- und Hypophasen wurden in kleinen Reagensröhrchen durch Abpipettieren getrennt und chromatographiert (s.S. 14).

Befund: Ameisen- und Essigsäurehydrazid. Somit war ausser Ameisen- auch Essigsäure vorhanden.

Direkte Wasserdampfdestillation:

Mi 1 l angesäuertem Kulturfiltrat wurde direkt eine Wasserdampfdestillation durchgsführt, bis sich 1 l Destillat in der mit etwas festem NaOH p.a. versehenen Vorlage gesammelt hatte. Das Destillat wurde auf dem

Wasserbad im Vakuum eingeengt, neutralisiert und einer zweiten Wasserdampfdestillation nach der auf Seite 6 angeführten Methode unterworfen. Jeweils die ersten 6o ml Destillat wurden aufgefangen, vereinigt und eingeengt. In dem mit den Solventien (C) und (D) chromatographierten Rückstand konnten nachgewiesen werden: Formiat (+ Acetat ?), Propionat, Butyrat und Valerat.

Prüfung auf Fettalkohole:

Die vorstehend wiedergegebenen Befunde liessen erkennen, dass sich Fettsäuren mit mehr als 3 C-Atomen nur in geringem Umfange angereichert hatten. Es wurde daher geprüft, ob sich nicht statt dessen entsprechende Alkohole als direkte Produkte der KW-Oxydation angereichert hatten. Das Kulturfiltrat wurde mit festem NaOH p.a. alkalisiert bis zu einer Konzentration von ca. o,5 Mol NaOH pro Liter Filtrat und einige Tage bei 3o°C gehalten. Solches Filtrat wurde analog der Extraktion von saurem Filtrat kontinuierlich extrahiert. Nach Beendigung dieser Extraktion wurde das Kulturfiltrat dann auf Säuren extrahiert.

Der Ätherextrakt von 2 l alkalischen Filtrates wurde unter einer Raschigring-Kolonne sehr langsam bis auf einige ml eingeengt. Chromatogramme nach der Methode von Seite 12 gaben keinen Hinweis auf das

Vorhandensein grösserer Mengen von $C_8$-$C_{12}$-Alkoholen, und die Molybdat-Probe auf Xanthogenate nach PAECH und TRACEY II (1955, S. 406-407) fiel negativ aus. Daraufhin wurden die Ätherextrakte von mehreren Litern alkalischer Filtrate ebenso bis auf 2-3 ml eingeengt und analog den Angaben auf Seite 11 behandelt (3 ml $CS_2$ p.a., 0,6 g KOH p.a., 30 min Schütteln). Der geringe Niederschlag der ersten Fällung wurde mit Äther gewaschen, in Aceton gelöst und chromatographiert (s.S. 11).

Befund: K-Xanthogenate von Fettalkoholen konnten papierchromatographisch nicht eindeutig nachgewiesen werden.
Die Prüfung auf Xanthogenate mit Molybdat fiel negativ aus.

Prüfung auf nichtflüchtige aliphatische Carbonsäuren:

Bei der Chromatographie auf Fettsäuren zeigte sich das Vorhandensein von grösseren Mengen Säuren, die noch hydrophiler als Ameisensäure waren. Auf Grund dessen wurde die zweidimensionale Papierchromatographie solcher Säuren erprobt und das Seite 15 angeführte Verfahren auf die aus den sauren Kulturfiltraten extrahierten Substanzen angewandt.

Befund:
Es lag überwiegend Bernsteinsäure neben etwas Milchsäure vor. Ausserdem eine nicht identifizierbare Substanz $\alpha$, deren $R_f$-Wert in Solvens (D) demjenigen von

Sebacat und in den Solventien (C), (K), (L) und (M) dem von Glykolat bezw. Glykolsäure entsprach. Die Identität der Milchsäure bezw. die Einheitlichkeit des Fleckens ist auf Grund der späteren radioautographischen Befunde als nicht ganz sicher anzusehen.

Die pH-Verschiebung schwach gepufferter Nährlösungen zum sauren Bereich hin findet insbesondere durch die Anhäufung von Bernsteinsäure im Medium eine Erklärung.

Mengenabschätzung:

Das Ergebnis der letztangeführten Prüfung liess nun eine ungefähre Kalkulation der Mengenverhältnisse zu. In der durch Einengen der wässrigen $NH_3$-Phase erhaltenen Substanz lagen etwa vor:

| | |
|---|---|
| Succinat (+ $\gamma$ und $\delta$ ; s. weiter unten) | > 15 % |
| Formiat + Acetat | > 15 % |
| Propionat + Lactat (+ Chlorid ?) | ≈ 15 % |
| Butyrat (+ Chlorid ?) | < 8 % |
| Valerat (+ ß; s. weiter unten) | < 8 % |
| Nitrat | > 8 % |

3. Anzucht in Anwesenheit von Undecan-1-$C^{14}$

Durch Anbieten eines markierten, definierten Kohlenwasserstoffes sollte der Verbleib des KW-Kohlenstoffs verfolgt und die Suche nach Abbauprodukten des Alkans erleichtert werden.

Anzuchtbedingungen:

Die Anzucht erfolgte in abgeschlossenen Gasräumen. Zu dem Zweck kamen die Kulturkolben in grosse Anaerobengefässe bezw. Exsikkatoren, die zum Absaugen des Gasraumes eingerichtet worden waren. Die Kolben (Erlenmeyer-Kolben und kleine Fernbach-Kolben) waren mit je 25 bezw. 75 ml NL IX beschickt und mit Glasbechern verschlossen worden. In jedes der 3 Anzuchtgefässe wurde ein offenes Gläschen mit o,25 ml n-Undecan + 2o $\mu$l Undecan-1-$C^{14}$ mit 188 $\mu$c gestellt. Zur Dichtung der Schliffe diente ein Paraffin-Vaseline-Gemisch, und zum Andrücken der Gefässdeckel wurde ein geringer Unterdruck geschaffen. Die Gefässe wurden für 4 Wochen in einem Brutschrank von 3o°C untergebracht.

Verarbeitung für die C-Bilanz:

Der flüssige KW war bei Abbruch des Versuches verdunstet. Das $CO_2$ der Gasräume wurde sorgfältig in carbonatfreier Barytlauge aufgefangen. Aus dieser Suspension wurde das $BaCO_3$ entsprechend den Angaben auf Seite 17 gewonnen, zu Meßpräparaten verarbeitet und zur Messung gebracht. Um die Abwesenheit von evtl. anhaftendem markiertem Undecan sicherzustellen, wurde ein Meßpräparat in der Barker-Apparatur (s.S. 8) umgefällt. Die Aktivität dieses neuen Meßpräparates entsprach aber der zuvor gemessenen.

Nach der Reinheitsprüfung wurde der Bewuchs der Kulturkolben in der Mensurnutsche gesammelt (vgl. S. 2o). Seine Menge entsprach 29 mg Trockensubstanz. Er wurde nach Zugabe von Formol und Glasperlen suspendiert, mit aq.dest. gewaschen und darin wieder aufgenommen. Aliquote Mengen dieser Suspension wurden abpipettiert und das Lösliche jeweils in einem Filtergerät 95v (Schott & Gen., Mainz) mit Glasfilterplatte 1o6r G 5 24 mm Ø (Sonderanfertigung) abgesogen (vgl. S. 17). Die Zellsubstanz auf diesen Filterplatten wurde im Vakuumexsikkator über Silicagel bei 3o°C getrocknet und auf diesen Platten, wie Seite 8 angeführt, verascht (unter Zufügung von Na-Oxalat). Das angefallene $BaCO_3$ wurde meßfähig präpariert (s.S. 17).

Von dem durchmischten Kulturfiltrat wurden 35 ml-Proben entnommen und nach der modifizierten Weinhouse-Methode unter Zusatz von Na-Acetat aufgearbeitet (s.S. 9). Aus dem $BaCO_3$ wurden ebenfalls Meßpräparate hergestellt.

Ergebnisse der C-Bilanz:

Von dem bei Versuchsbeginn vorhandenen C (99,5 % Undecan-C und o,5 % $CO_2$-C) wurden am Ende der Anzucht 8,5 % wieder erfasst. Nach Abzug des ursprünglich vorhandenen $CO_2$-C verblieben 8 % Kohlenstoff, der dem Kohlenwasserstoff entstammen musste. Von diesem Kohlen-

Tab.3. $C^{14}$-Radioaktivität (Imp/min) der Zellen, des Kulturfiltrates und des Gefäßraum-$CO_2$ nach Anzucht mit Undecan-1-$C^{14}$.

| | Zellen | Kulturfiltrat | Gefäßraum-$CO_2$ |
|---|---|---|---|
| Pro $BaCO_3$-Meßpräparat verarbeiteter Anteil | 0,364 | ca.0,033 | 1 |
| Mittelwert der Aktivität der $BaCO_3$-Meßpräp. | $65,0 \cdot 10^5$ | $7,20 \cdot 10^5$ | $0,60 \cdot 10^5$ |
| Gesamtaktivität | $179 \cdot 10^5$ | $216 \cdot 10^5$ | $136 \cdot 10^5$ |
| Verhältnis der Gesamtaktivitäten | 1,3 | 1,6 | 1,0 |
| Spezifische Aktivität (pro mg $BaCO_3$) +) | $1,40 \cdot 10^5$ | $0,6 \cdot 10^5$ | $0,60 \cdot 10^5$ |
| Verhältnis der spezifischen Aktivitäten | 2,3 | 1 | 1 |

+) berechnet ohne Träger-$BaCO_3$

stoff entfielen 19 % auf die Zellsubstanz, 54 % auf die organischen Verbindungen des Filtrates und 27 % auf neu gebildetes $CO_2$ in der Gefäß-Atmosphäre. Die Menge des Kohlenstoffes der Zellen entsprach mindestens der dreifachen Menge an ursprünglich bei Versuchsbeginn vorhandenem $CO_2$-C. Nach der Ba-Carbonatmenge zu schliessen, die durch Absaugen des Gasraumes erhalten wurde, muss in den Anzuchtgefäßen eine $CO_2$-Endkonzentration von ca. o,16 Vol% geherrscht haben. Das ist das Fünffache des $CO_2$-Gehaltes der Luft. Das in den verarbeiteten Filtratproben noch gelöste $CO_2$ (ca. 11 $\gamma$/l bei 2o°C) und Undecan konnten wegen der äusserst geringfügigen Mengen unberücksichtigt bleiben. Die Verteilung des $C^{14}$ auf die untersuchten Fraktionen (Zellsubstanz, Kulturmedium und freies $CO_2$) kann der Tab. 3 entnommen werden.

Das Ergebnis bewies abermals die Fähigkeit von Nocardia petroleophila, gesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe umzusetzen. Darüber hinaus zeigte sich eindeutig, dass Undecan-Kohlenstoff zum Aufbau körpereigener Substanz verwendet wurde. Bemerkenswert war auch hier wieder der relativ hohe Betrag der in das Kulturfiltrat übergetretenen organischen Substanzen, die ihre Herkunft aus dem Undecan einzig der Stoffwechseltätigkeit der Nocardia verdankten. Das am Ende der Anzucht vorliegende $CO_2$ entstammte sicherlich z.T. der endogenen Atmung. Die relativ hohe $CO_2$-Endkonzentration liess jedoch vermuten, dass $CO_2$ auch eines der KW-Abbauprodukte ist. Die Radio-

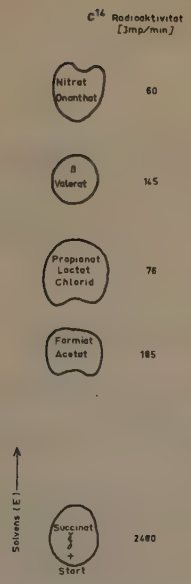


Abb. 5. Nachgezeichnetes Papierchromatogramm mit $NH_4$-Salzen aus Kulturfiltrat einer Anzucht mit Undecan-1-$C^{14}$.

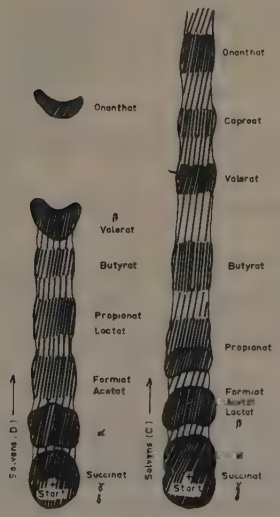


Abb. 6. Nachgezeichnete Radioautogramme (li. 79o h, re. 1o6o h exponiert) von Papierchromatogrammen mit $NH_4$-Salzen aus Kulturfiltrat einer Anzucht mit Undecan-1 -$^4C^{14}$.

aktivität des Gefäßraum-$CO_2$ ermöglicht hierüber keine Entscheidung, da bei der langen Kulturdauer sicher auch grössere Mengen $C^{14}O_2$ durch Restatmung entstanden waren.

Verarbeitung des Kulturfiltrates:

Die starke Radioaktivität des Kulturmediums liess die Auffindung von markierten Stoffwechselprodukten hoffnungsvoll erscheinen. Der grosse Rest des Kulturfiltrates (knapp 1 l) wurde zuerst im alkalisierten, dann im angesäuerten Zustande im Kutscher-Steudel-Apparat extrahiert (über 4o bezw. über 51 h lang). Die Ätherextrakte wurden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, verarbeitet und die gewonnenen Substanzen papierchromatographisch, radiometrisch und radioautographisch untersucht.

Ergebnisse der Kulturfiltrat-Untersuchung:

a) Papierchromatographischer Befund:

Es lagen vor Formiat, Acetat, Propionat, Valerat, viel Bernsteinsäure, etwas Milchsäure und (oder) Substanz ß (vgl. weiter unten), Substanz $\alpha$ . In den Abb. 5-8 sind einige Chromatogramme und Radioautogramme als Beispiele wiedergegeben. Zur Bestätigung der Befunde wurde auch der Rückstand der Wasserdampfdestillation (vgl. S. 6) wieder aufgearbeitet. Formiat (+ Acetat ?), Bernstein- und Milchsäure, Substanz $\alpha$ und ß wurden wie erwartet

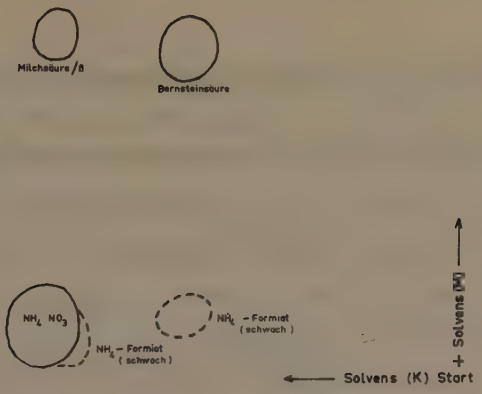


Abb. 7. Nachgezeichnetes zweidimensionales Papierchromatogramm mi: Bernsteinsäure, Milchsäure und Substanz ß aus Kulturfiltr: einer Anzucht mit Undecan-1-$C^{14}$.

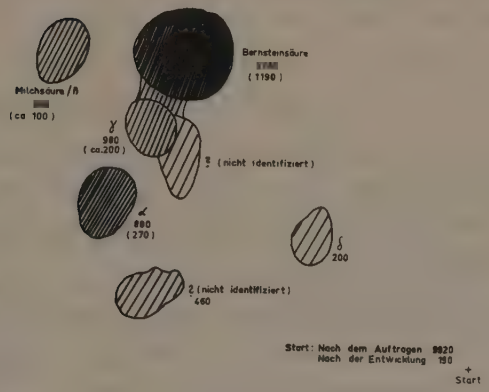


Abb. 8. Nachgezeichnetes Radioautogramm (8oo h exponiert) zum Papierchromatogramm der Abb. 7 mit den Werten der $C^{14}$-Radioaktivität (Imp/min) der Flecken nach der Exponierung. In Klammern die Werte eines anderen Chromatogrammes zum Vergleich.

gefunden und ihre Markierung festgestellt.

b) Radiometrischer und radioautographischer Befund:

Als markiert erwiesen sich Formiat (+ Acetat), Propionat, Butyrat, Valerat, Caproat und Önanthat (vgl. Abb. 5. u. 6). Den Abbildungen können die Werte der Radioaktivitäten zu den betreffenden Chromatogrammflecken entnommen werden. Butyrat, Caproat und Önanthat waren mit den pH-Indikatoren nicht mehr nachweisbar gewesen. Auf den zweidimensionalen Chromatogrammen für nichtflüchtige Carbonsäuren waren radioaktiv (vgl. Abb. 8): Bernsteinsäure, Milchsäure (?) und mindestens 4 nicht identifizierte Substanzen $\alpha - \delta$. Von diesen waren $\gamma$, $\delta$ und die weiteren im Verhältnis nur in geringen Mengen vorhanden. Sie konnten mit den verwendeten pH-Indikatoren nicht nachgewiesen werden, was bei der Substanz $\alpha$ ebenfalls meist der Fall war. Die Substanz ß hatte in Solvens (D) den gleichen $R_f$-Wert wie Valerat oder Caproat und in den Solventien (C), (K), (L) und (M) wie Lactat bezw. Milchsäure. Die Substanz $\alpha$ wurde bereits erwähnt (s.S. 29).
Diese Ergebnisse stimmten weitgehend mit denen der Anzuchten in einer Atmosphäre mit gerad- und ungeradzahligen Alkanen (Esso-Varsol) überein. Die Markierung der $C_3$-$C_7$-Fettsäuren lässt diese nun deutlich als KW-Abbauprodukte erkennen. Während das gleiche auch für das Formiat angenommen werden kann, könnte Acetat dem allgemeinen Stoffwechsel entstammen. Insbesondere liegt

keine $C_2$-Alternanz bei diesen Säuren vor, wie die Radioautogramme erwiesen. Interessant bleibt das extracelluläre Auftreten der Produkte der Alkan-Oxydation, vielleicht ein Hinweis dafür, dass die Oxydation an den äussersten plasmatischen Grenzschichten der Zellen erfolgt.

4. Anzucht in Anwesenheit von Decan-1-$C^{14}$

Die Umsetzung eines geradzahligen Kohlenwasserstoffes durch den Organismus sollte helfen, weitere Anhaltspunkte über die Art der KW-Oxydation und -Assimilation zu gewinnen. Ausserdem sollte der Einbau des Alkan-C in das Zelleiweiss direkt durch Aminosäure-Chromatographie nachgewiesen werden.

Anzuchtbedingungen:

In 4 Anzuchtgefäße (vgl. S. 31) wurden beimpfte Kulturkolben wie bei dem Versuch mit Undecan gestellt. Jedes Gefäß erhielt ein Gläschen mit o,25 ml n-Decan olefinfrei, purum, 99 %ig (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz) + 2o $\mu$l Decan-1-$C^{14}$ mit 4,26 $\mu$c. Es wurde 24 Tage bei 3o°C bebrütet.

Verarbeitung:

Bei Abbruch des Versuchs war das Decan verdunstet, die Gasräume wurden mit einem $CO_2$-freien Luftstrom über eine

Waschflaschenanordnung mit Barytlauge abgesogen. Die Radioaktivität des gefällten $BaCO_3$ wurde gemessen. Nach der Reinheitsprüfung wurden Bewuchs und Kulturmedium in der Mensurnutsche getrennt.

Die Nocardia-Substanz in der Nutsche wurde mit aq.dest. gewaschen und vollständig in das Membranfiltergerät Coli-5 gespült. Von dort wurde das Zellmaterial in ein Wägegläschen überführt, zum Abtöten für 1o min auf 11o°C erhitzt und bei 3o°C über Silicagel getrocknet. Die Ausbeute betrug 53 mg Trockensubstanz. hiervon wurden 1o mg hydrolysiert (s.S. 17) und die erhaltene Lösung zweidimensional chromatographiert (s.S.16). Die $C^{14}$-Radioaktivität der Flecken wurde direkt mit dem Zählrohr und durch Radioautographie untersucht.
Der Rest des Zellmaterials wurde mit 5 ml o,1 N-$H_2SO_4$ p.a. über 2o min lang in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator aus Glas zerrieben. Diese Zellsuspension wurde mit 3o ml der gleichen Säure in den Einsatz des kleinen Extraktors der Abb. 1 gespült und mit Äther 51 h lang extrahiert. Die erhaltenen $NH_4$-Salze wurden entsprechend papierchromatographisch analysiert.

Das Kulturfiltrat wurde mit aq.dest. auf 2 l aufgefüllt, angesäuert und im Kutscher-Steudel-Apparat knapp 52 h lang extrahiert. Die Untersuchung der gewonnenen Substanz erfolgte entsprechend wie bei den An-

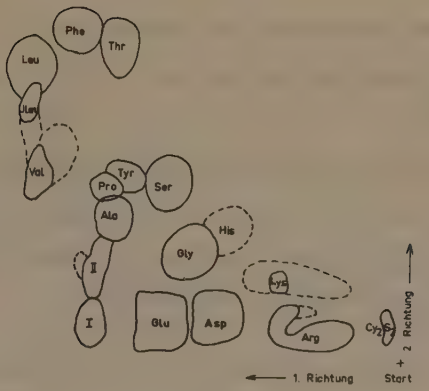


Abb. 9. Nachgezeichnetes zweidimensionales Papierchromatogramm mit Aminosäuren und Substanz I und II aus Zellenhydrolysat einer Anzucht mit Decan-1-$C^{14}$ (vgl. Tab. 5).

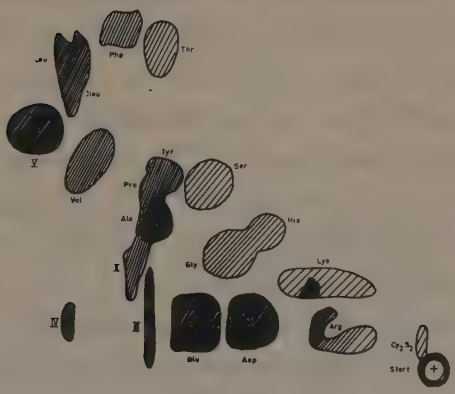


Abb. 10. Nachgezeichnetes Radioautogramm (175o h exponiert) zum Papierchromatogramm der Abb. 9 (vgl. Tab. 5).

zuchten mit Esso-Varsol und Undecan.

Ergebnisse:

a) Das $CO_2$ der Gefäßatmosphäre zeigte auch in diesem Versuch eine starke Radioaktivität. Das Decan wurde also bis zu $CO_2$ oxydiert, sei es unmittelbar oder auf dem Wege über den endogenen Stoffwechsel.

b) Im Zellhydrolysat konnten die in der Tab. 5 aufgeführten Aminosäuren identifiziert werden. Sie waren sämtlich radioaktiv (s. Tab. 5). Methionin war anscheinend nur in so geringen Mengen vorhanden, dass es meist nicht nachweisbar war. Der Alkan-Kohlenstoff war jedenfalls in reichlicher Menge auch in den Eiweißstoffwechsel übergetreten. Abbauprodukte des Kohlenwasserstoffes dienten dem Organismus somit als C-Quelle. Bemerkenswert war die relativ hohe Radioaktivität der Glutaminsäure. HIRSCH (1958) hatte bei der Kultivierung der Nocardia unter Benzinatmosphäre mit $C^{14}O_2$ eine stark bevorzugte Markierung von Arginin festgestellt. In zwei weiteren Anzuchtversuchen mit $C^{14}O_2$ und Decan bezw. Undecan konnte ich diesen Befund bestätigen (s.S. 40 u. Tab. 5). Danach scheint es, als ob bei Darbietung von markiertem KW + $CO_2$ die Glutaminsäure bevorzugt radioaktiv wird, während mit nichtmarkiertem KW + $C^{14}O_2$ Arginin die höchste Radioaktivität aufweist.

Tab.4. $C^{14}$-Radioaktivität (Imp/min) in Papierchromatogrammen von Substanzen aus trockenen Zellen und Kulturfiltrat einer Anzucht mit Decan-1-$C^{14}$.

| | Trockene Zellen | Kulturfiltrat | | |
|---|---|---|---|---|
| Solvens | (D) | (D) | (L)/(M) | (L)/(M) |
| Start nach Auftragen | 460 | 1980 | 1590 | 1720 |
| Start nach Entwickl. | - | - | 17 | 22 |
| Formiat/Acetat | 33 | 60 | - | - |
| Propionat/Lactat | - | 25 | - | - |
| Butyrat | 19 | - | - | - |
| Valerat/ß | 6 | - | - | - |
| α | - | 220 | - | - |
| Succinat/γ/δ | 197 | 940 | - | - |
| ß/Butyrat | - | 270 | - | - |
| Caproat | - | 66 | - | - |
| Önanthat/Caprylat | - | 64 | - | - |
| Caprylat/Pelargonat | - | 26 | - | - |
| Bernsteinsäure | - | - | 620 | 665 |
| Milchsäure/ß | - | - | 250 | 250 |
| α | - | - | 175 | 170 |

Ausser den Aminosäuren fanden sich, teils schon durch die Ninhydrin-Reaktion kenntlich, teils erst radioautographisch nachweisbar, Substanzen im Chromatogramm, die nicht identifiziert werden konnten. Darunter ist die Substanz V wegen ihrer hohen Radioaktivität (vgl. den Schwärzungsgrad, Tab. 5) besonders zu beachten. Auf Grund der langen Expositionszeit der Radioautogramme musste auf eine nachträgliche Aktivitätsmessung dieser Substanzen verzichtet werden. Die Abb. 9 und 10 zeigen das in der Tab. 5 ausgewertete Chromatogramm mit dem korrespondierenden Radioautogramm.

c) Im Ätherextrakt der Zelltrockensubstanz fanden sich papierchromatographisch Formiat (+ Acetat ?), Propionat (?), Butyrat, Bernsteinsäure, etwas Milchsäure und (oder) Substanz ß. Die gleichen Verbindungen konnten auch radiometrisch (vgl. Tab. 4) bezw. radioautographisch nachgewiesen werden, waren also markiert.

d) Im Ätherextrakt des Kulturfiltrates liessen sich nachweisen: Formiat, Acetat, Propionat (?), Önanthat und (oder) Caprylat, viel Bernsteinsäure, etwas Milchsäure und (oder) Substanz ß, Substanz $\alpha$ . Dabei lagen die $C_3$-$C_8$-Fettsäuren auch hier in geringen Mengen vor. Als radioaktiv erwiesen sich (vgl. Tab. 4) Formiat (+ Acetat), Propionat, Butyrat, Valerat, Caproat, Önanthat und (oder) Caprylat, Pelargonat, Bernsteinsäure, Milchsäure und (oder) Substanz ß, Substanz $\alpha$ ,

(Substanz $\gamma$ und $\delta$ ?).

Die Befunde von c) und d) wichen also praktisch nicht von den Ergebnissen der Anzucht mit Undecan-1-$C^{14}$ ab. Auch hier wurden sowohl Fettsäuren mit einer geraden als auch einer ungeraden Anzahl von C-Atomen beobachtet. Sie waren ebenfalls radioaktiv.

## 5. Anzucht in Anwesenheit von $C^{14}O_2$ und n-Undecan oder n-Decan

Wie die Untersuchungen von HIRSCH (1958) und meine Warburg-Versuche gezeigt hatten, wurde während der Kohlenwasserstoff-Oxydation $CO_2$ verstärkt assimiliert. Die Anzuchten in einer Atmosphäre mit $C^{14}O_2$ und definierten Kohlenwasserstoffen stellten nun die Gegenkontrolle zu den vorhergehenden Versuchen dar.

### Anzuchtbedingungen:

Die Kulturen wurden ganz analog den Versuchen mit Undecan-1-$C^{14}$ bezw. Decan-1-$C^{14}$ herangezogen. Nur befand sich in jedem Anzuchtgefäß ausser einem Gläschen mit unmarkiertem n-Undecan bezw. n-Decan noch ein Glas mit einer berechneten Menge $C^{14}$-markiertem $BaCO_3$. In den verschlossenen Anzuchtgefäßen wurde dann aus diesem durch Zufügen von $HClO_4$ (1,67 reinst) das $CO_2$ freigesetzt. Es lag dann in einer Konzentration von o,o5 Vol% im Gasraum

Tab.5. Ninhydrin-Reaktion und $C^{14}$-Radioaktivität von Substanzen aus Zellenhydrolysat in Papierchromatogrammen und der geschätzte Schwärzungsgrad in korrespondierenden Radioautogrammen bei verschiedenen Anzuchten.

| | | Decan 1-$C^{14}$ + $CO_2$ | Un-decan +$C^{14}O_2$ | Decan + $C^{14}O_2$ | Decan 1-$C^{14}$ +$CO_2$ | Un-decan +$C^{14}O_2$ | Decan + $C^{14}O_2$ | Decan 1-$C^{14}$ +$CO_2$ | Un-decan +$C^{14}O_2$ | Decan + $C^{14}O_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Abkürz. | Ninhydrin-Reaktion | | | Schwärzungsgrad | | | Radioaktivität (Imp/min) | | |
| Start | | | | | | | | | | |
| nach Auftragen | - | - | - | - | - | - | - | 5450 | 940 | 1865 |
| nach Entwickl. | - | ? | ? | ? | + | + | + | 90 | 10 | - |
| Alanin | Ala | + | + | + | ++ | + | + | 158 | 26 | 70 |
| Arginin | Arg | + | + | + | ++ | ++ | ++ | 150 | 105 | 173 |
| Asparagins. | Asp | + | + | + | ++ | + | ++ | 212 | 50 | 138 |
| Cystin | $Cy_2S_2$ | + | + | + | + | + | + | 20 | 10 | 22 |
| Glutamins. | Glu | + | + | + | +++ | ++ | ++ | 429 | 78 | 106 |
| Glycin | Gly | + | + | + | + | + | + | 99 | 36 | 76 |
| Histidin | His | + | + | - | + | + | - | 26 | 20 | - |
| Isoleucin | Ileu | + | + | + | + | + | + | 90 | 24 | 23 |
| Leucin | Leu | + | + | + | ++ | + | + | 134 | 7 | 31 |
| Lysin | Lys | + | + | + | + | + | + | 65 | 15 | 26 |
| Methionin | Met | - | + | - | - | + | - | - | 3 | - |
| Phenylalanin | Phe | + | + | + | + | + | + | 74 | 19 | 24 |
| Prolin | Pro | + | + | - | + | + | - | 47 | 15 | - |
| Serin | Ser | + | + | + | + | + | + | 48 | 13 | 23 |
| Threonin | Thr | + | + | + | + | + | + | 49 | 26 | 39 |
| Tyrosin | Tyr | + | + | - | + | + | - | 51 | 32 | - |
| Valin | Val | + | + | + | ++ | + | + | 156 | 21 | 41 |
| Substanz | I | + | + | + | ø | ø | ø | - | - | 44 |
| " | II | + | + | + | ++ | + | + | 135 | 31 | 143 |
| " | III | ø | ø | ø | + | + | + | 36 | 11 | - |
| " | IV | ø | - | ø | + | - | + | - | - | - |
| " | V | ø | ø | ø | +++ | ++ | ++ | - | - | - |
| " | VI | ø | - | - | <+ | - | - | - | - | - |
| " | VII | ø | - | - | <+ | - | - | - | - | - |
| " | VIII | ø | - | - | <+ | - | - | - | - | - |

vor. Nach je 21 Tagen wurden die Anzuchten abgebrochen.

Verarbeitung:

Die Arbeitsgänge entsprachen dem Anzuchtversuch mit Decan-1-$C^{14}$. Die Herstellung eines $BaCO_3$-Meßpräparates des aus den Gasräumen abgesaugten $CO_2$ unterblieb hier. Die Anzucht mit Undecan ergab einen Bewuchs von 11 mg Trockengewicht, diejenige von Decan einen von 9 mg. Das Zellmaterial wurde hydrolysiert und die erhaltenen Aminosäuren wie beim Decan-1-$C^{14}$-Versuch untersucht. Die Kulturfiltrate mit dem Spülwasser (je ad 1 Liter) wurden angesäuert und 42,5 bezw. 46 h mit Äther extrahiert. Die aus dem jeweiligen Extraktionsäther gewonnenen $NH_4^+$-Salze wurden der schon beschriebenen Analyse unterzogen.

Ergebnisse:

a) Die Papierchromatographie der Zellhydrolysate beider Anzuchten führte zu dem gleichen Befund wie bei der Kultivierung mit $C^{14}$-Alkanen (s. Tab. 5). Die Aminosäuren waren radioaktiv, wie HIRSCH (1958) bereits gezeigt hatte. $CO_2$ diente dem Organismus demnach als C-Quelle, ob ausschliesslich, sollte hier nicht entschieden werden. Es bestätigte sich schon Seite 38 erwähnte relativ starke Markierung des Arginins. Zu einem weiteren Vergleich bezüglich der Reihenfolge in der Aktivität der Säureflecken erschienen die Ergebnisse der beiden obigen

Versuche nicht geeignet. Die Radioaktivität der Verbindungen war zu gering. Beachtenswert war wiederum, dass auch hier u.a. die Substanz V auftrat.

b) In den Ammoniumsalzen der Kulturfiltrat-Extrakte fanden sich:

n-Undecan-Anzucht:

Formiat,
Acetat,
[Propionat ?],
Bernsteinsäure,
[Milchsäure u. (od.) Substanz ß],
[Substanz α].

n-Decan-Anzucht:

Formiat (+ Acetat ?),
[Propionat],
[Butyrat],
[Önanthat u. (od.) Caprylat],
Bernsteinsäure,
Milchsäure u. (od.) Substanz ß,
Substanz α .

Die eckige Klammer bedeutet: in relativ kleinerer Menge vorhanden.

Durch Radiometrie und Radioautographie konnte nur Bernsteinsäure eindeutig nachgewiesen werden. Zwar war die am Chromatogrammstart aufgetragene Substanz - entsprechend der geringen Aktivität des bei der Anzucht verwendeten $C^{14}O_2$ - auch nur wenig markiert, aber

es wurde 1100 h exponiert.

Das sich im Medium anreichernde Succinat kann kein direktes Folgeprodukt der KW-Oxydation sein. Denn nach den Anzuchten mit markiertem Undecan oder Decan zeigte sich zwar, dass diese Bernsteinsäure Kohlenstoff aus den Alkanen enthält, aus den Versuchen mit $C^{14}O_2$ ergab sich aber andererseits, dass der Succinat-Kohlenstoff auch aus $CO_2$ stammt. Demnach ist also anzunehmen, dass die Bernsteinsäure im allgemeinen Stoffwechsel gebildet wird. Die Anhäufung der Bernsteinsäure während der Kultivierung in der Nährlösung lässt diese als ein Endprodukt des Stoffwechsels erscheinen.

Actinomyces violaceus sammelt bei den Substraten Pyruvat oder Glucose u.a. ebenfalls Bernsteinsäure in der Nährlösung an (BEKHTEREVA 1960). Die Auffindung der anderen Verbindungen bestätigte die Ergebnisse der vorangehenden Versuche.

SCHLUSSBETRACHTUNG.

Untersuchungen über den bakteriellen Alkan-Abbau sind im letzten Jahrzehnt in steigendem Maße angestellt worden mit der Fragestellung: Liegt ß-Oxydation vor oder nicht? Meist wurde mit technisch leicht zu handhabenden Organismen experimentiert. Bei manometrischen Messungen wurde z.T. mit ruhenden Zellen gearbeitet, die nicht in Anwesenheit der Kohlenwasserstoffe herangezogen worden waren.

Bei Serratia marcescens (Glucose- oder Fettsäure-adaptiert) konnten SILLIKER und RITTENBERG (1951a, b; 1952) keine Anhaltspunkte über eine ß-Oxydation beim Anbieten von Fettsäuren finden.

WEBLEY et al. (1955) wiesen bei der auf Glucose kultivierten Nocardia opaca Waksman u. Henrici ß-Oxydation von ω-Phenyl-substituierten Fettsäuren ($C_2$-$C_8$) nach. n-Alkane ($C_{12}$-$C_{18}$), Fettsäuren u.a.m. konnten dieser Art auch als einzige Energie- und C-Quelle dienen (WEBLEY 1954). Wenig später arbeiteten WEBLEY et al. (1956) zusätzlich mit Nocardia sp. $P_2$. Bei dieser Art konnten sie das Auftreten von ß-Oxydation im Verlaufe des Abbaues z.B. von Phenyl-Decan, -Dodecan, bezw. -Octadecan wahrscheinlich machen. Phenyl-Essigsäure wurde in diesem Falle isoliert. Durch weitere Unter-

suchungen von WEBLEY et al. (1957, 1958, 1959) wurde dieser Befund gestützt. Nach einem mutmaßlichen Initialangriff durch ω-Oxydation ist die entstehende Säure dann einer ß-Oxydation ausgesetzt.

KESTER und FOSTER (1960) arbeiteten mit Reinkulturen eines nicht identifizierten Gram-positiven Stäbchens. Dieses bildete bei Oxydation von Alkanen (z.B. Tetradecan) als einzige Energie- und C-Quellen die entsprechenden homologen Dicarbonsäuren. Es fand also ein diterminaler Angriff am Substrat statt.

RAYMOND und DAVIS (1960) untersuchten eine Nocardia aus dem Boden, die n-Hexadecan und n-Octadecan schnell verwertete. Die Zellen bestanden dann zu 70 % aus Lipiden, die sich wiederum zu 60 % aus Glyceriden und zu 40 % aus Cetylpalmitat (bei Hexadecan-Oxydation) zusammensetzten. Ein von STEWART et al. (1959a, b) isolierter Gram-positiver Coccus bildete aus n-Hexadecan Palmitinsäureester (u.a. Cetylpalmitat), aus n-Octadecan Stearinsäureester. Da molekularer Sauerstoff am Oxydationsprozess teilnahm, wird als Zwischenprodukt, nach dem terminalen Angriff, 1-Hexadecylhydroperoxyd angenommen.

LEADBETTER und FOSTER (1958, 1959a, b, 1960) arbeiteten über den oxydativen Abbau von Äthan, n-Propan

und n-Butan durch Pseudomonas methanica. Sie konnten u.a. den Einbau von molekularem Sauerstoff nachweisen. Als Ergebnis ihrer Untersuchungen entwickelten sie eine Hypothese, wonach das simultane Auftreten von Fettalkoholen und Fettsäuren einerseits und Methylketonen andererseits über den Weg: freie Alkan-Radikale → Alkan-Hydroperoxyde primärer bezw. sekundärer Alkohol mit korrespondierender C-Kette erklärt wird.

Pseudomonas pyocyanea bildete nach POMORTSEVA (1957) mit Heptan als Energie- und C-Quelle Ameisen-, Essig- und Propionsäure sowie höhermolekulare nicht identifizierte Säuren. Die Oxydationsprodukte von Octan waren die gleichen bis auf Ameisensäure. Als Zwischenprodukte traten Aldehyde und flüchtige Säuren auf.

SENEZ und KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER (1956) konnten durch Anzucht von Pseudomonas aeruginosa auf Mineralmedium mit n-Heptan die vollständige homologe Reihe der $C_2$-$C_7$-Fettsäuren im Kulturfiltrat nachweisen. Daraus wurde auf eine monoterminale Oxydation des Heptans mit nachfolgender Decarboxylierung geschlossen. Ausserdem lagen im Medium nichtflüchtige Säuren vor, von denen eine als Bernsteinsäure identifiziert wurde. Darum wurde angenommen, dass ausserdem vielleicht ein Oxydationsmechanismus über Dicarbonsäuren abläuft.

Auf Grund ihrer Versuche mit einem Pseudomonas-Stamm nehmen THIJSSE und VAN DER LINDEN (1958) an, dass die Oxydation von n-Hexan und n-Heptan an einer der endständigen $CH_3$-Gruppen erfolgt und über den entsprechenden Alkohol und Aldehyd zur Fettsäure führt. Diese wird dann durch ß-Oxydation bis zu $CO_2$ und $H_2O$ abgebaut, wobei die Propionylgruppe durch ein aufgefundenes konstitutives System oxydiert wird. Sie fanden keine Hinweise für das Vorhandensein eines zweiten Abbauweges über $C_1$-Körper.

Die Befunde meiner Untersuchungen an Nocardia petroleophila Stamm 78 lassen die Annahme einer ß-Oxydation für die als Zwischenprodukte aufgefundenen Fettsäuren nicht zu. Denn es wurden sowohl Säuren mit einer geraden als auch einer ungeraden Anzahl von C-Atomen bei Vorgabe von n-Decan bezw. n-Undecan nachgewiesen. Die im Medium angereicherte Bernsteinsäure erwies sich auch bei Kultivierung mit nichtmarkierten Alkanen unter $C^{14}O_2$-Atmosphäre als stark radioaktiv. Sie ist demzufolge ein Ausscheidungsprodukt, das primär mit der KW-Oxydation nicht in Zusammenhang steht, denn Kohlenstoff aus $CO_2$ wird in grösserem Umfange assimiliert und gelangt so in den allgemeinen Stoffwechsel. Andere korrespondierende Dicarbonsäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Das Wahrscheinlichste ist nach den vorliegenden Ergebnissen somit:
monoterminaler Angriff am Alkan, Bildung der entsprechen-

den Fettsäure und Verkleinerung ihrer C-Kette durch $C_1$-Körperabspaltung (Decarboxylierung ?) bis zu niederen Fettsäuren. Diese reichern sich vorübergehend an, da ihre Umsetzungsgeschwindigkeit offensichtlich geringer als die der höheren Homologen ist. Aber auch sie werden schliesslich völlig abgebaut. Die abgespaltenen $C_1$-Körper ($CO_2$ ?) treten z.T. in den Baustoffwechsel über.

Zwei Stoffwechseltypen könnte die Nocardia alternativ zugeordnet werden: Heterotrophie mit $CO_2$-Assimilation (dabei dienen die Alkane nicht nur als Energiequelle, sondern ihre Abbauprodukte - ausser $CO_2$ - auch als Kohlenstoffquelle) oder eine C -Assimilation ausschliesslich aus $CO_2$ mit der Energie aus der Alkan-Oxydation, d.h. Autotrophie in Bezug auf die C-Quelle.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch nicht entschieden werden, ob ausser $CO_2$ auch andere Produkte des Alkan-Stoffwechsels als C-Quelle dienen. Dafür wären weitere Versuche mit $C^{14}$-markierten Substraten - z.B. Formiat und Acetat - oder die Analyse von Intermediärprodukten, die sich unter dem Einfluss von Hemmstoffen anstauen, notwendig. Empfehlenswert wäre dabei die Verwendung zellfreier Extrakte.

ZUSAMMENFASSUNG.

1.) Im Kulturfiltrat von intakten Zellen wurden $C_1$-$C_9$-Fettsäuren (ohne $C_2$-Alternanz) als Produkte des n-Decan- oder n-Undecan-Abbaues nachgewiesen. Dabei lagen die niederen Homologen in relativ grösserer Menge vor als die höheren, weil sie vermutlich langsamer angegriffen werden.

2.) $CO_2$ ist ein weiteres Oxydationsprodukt der von intakten Zellen verwerteten Kohlenwasserstoffe.

3.) Bernsteinsäure reicherte sich im Kulturmedium als ein Endprodukt des allgemeinen Stoffwechsels an.

4.) Die genannten Carbonsäuren wurden auch in der Zellsubstanz aufgefunden.

5.) Kohlenstoff aus n-Decan, n-Undecan und $CO_2$ wurde in relativ beträchtlichem Umfange in die Aminosäuren der Zellen eingebaut (assimiliert).

6.) Es wird ein monoterminaler Angriff auf die Alkane mit nachfolgendem völligen Abbau der C-Kette der intermediär auftretenden Fettsäuren durch $C_1$-Körperabspaltung angenommen.

LITERATURVERZEICHNIS.

BEKHTEREVA, M.N.: Oxidation of organic acids by Actinomyces violaceus str.719. Mikrobiologija (Mosk.) 29, 184-189 (196o).

CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, J.C. REID, B.M. TOLBERT and P.E. YANKWICH: Isotopic Carbon. New York-London: 1949.

CRAMER, F.: Papierchromatographie. 3. Aufl. Weinheim: 1954.

HAIS, J.M. und K. MACEK: Handbuch der Papierchromatographie. Bd. I. Jena: 1958

HIRSCH, P.: Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Nocardia petroleophila n.sp. Arch. Mikrobiol. 29, 368-393 (1958).

HIRSCH, P. und H. ENGEL: Über oligocarbophile Actinomyceten. Ber. dtsch. bot. Ges. 69, 441-454 (1956).

HOPPE-SEYLER und THIERFELDER: Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse. 1o. Aufl. Bd. III, 1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: 1955.

KARIYONE, T., Y. HASHIMOTO and M. KIMURA: Paper partition chromatography of alcohols using the potassium xanthogenates. Nature (London) 168, 511 (1951).

KESTER, A.S. and J.W. FOSTER: Diterminal oxidation of long chain alkanes by a bacterium. Bact. Proc. 196o, 168.

KREBS, H.A., D.H. SMYTH and E.A. EVANS: Determination of fumarate and malate in animal tissues. Biochem. J. 34, 1041-1045 (194o).

LEADBETTER, E.R. and J.W. FOSTER: Studies on some methaneutilizing bacteria. Arch. Mikrobiol. 3o, 91-118 (1958).

Oxidation products formed from gaseous alkanes by the bacterium Pseudomonas methanica. Arch. Biochem. Biophys. 82, 491-492 (1959a).

Incorporation of molecular oxygen in bacterial cells utilizing hydrocarbons for growth. Nature (London), Suppl. 18, 184, 1428-1429 (1959b).

Bacterial oxidation of gaseous alkanes. Arch. Mikrobiol. 35, 92-104 (1960).

LEDERER, E. and M. LEDERER: Chromatography. Amsterdam: 1953.

LINSKENS, H.P.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen-Heidelberg: 1955. 2. Aufl. 1959.

McCLENDON, J.F.: Microdetermination of volatile fatty acids in blood. J. biol. Chem. 154, 357-360 (1944).

NÄVEKE, R.: Formiatoxydation und Kohlenstoff-Assimilation bei Hyphomicrobium vulgare Stutzer et Hartleb. Arch. Mikrobiol. 27, 375-399 (1957).

PEACH, K. und M.V. TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Bd. I, 1956; Bd. II, 1955.

POMORTSEVA, N.V.: Die Bildung von organischen Säuren und Aldehyden in Kulturen des Pseudomonas pyocyanea bei der Oxydation von Kohlenwasserstoffen. (Russisch). Ref. in Ber. wiss. Biol. 126, 190 (1958).

RAYMOND, R.L. and J.B. DAVIS: n-Alkane utilization and lipid formation by a Nocardia. Bact. Proc. 1960, 158-159.

REDFIELD, R.R.: Two-dimensional paper chromatographic systems with high revolving power for amino acids. Biochim. biophys. Acta 10, 344-345 (1953).

RIECHE, A.: Ätherexplosionen und "Ätherperoxyde". Ztsch. angew. Chem. 1931, 896-899.

SEELER, G.: Untersuchungen über die Hemmung der Nitritoxydation von Nitrobacter winogradskyi durch Kaliumchlorat. Diplomarbeit, Hamburg 1958.

SENEZ, M.J.C. et M. KONOVALTSCHIKOFF-MAZOYER: Formation d'acides gras dans les cultures de Pseudomonas aeruginosa sur n-heptane. C.r. Acad. Sci. 242, 2873-2875 (1956).

SILLIKER, J.D. and S.C. RITTENBERG: Studies on the aerobic oxidation of fatty acids by bacteria. I. (1951a), II. (1951b), III. (1952).
J. Bact. 61, 653-659 (1951a), 661-673 (1951b).
J. Bact. 64, 197-205 (1952).

SPRINGER, U. und J. KLEE: Prüfung der Leistungsfähigkeit von einigen wichtigeren Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromschwefelsäure sowie Vorschlag einer neuen Schnellmethode. Ztsch. Pflanzenern. Düng. Bodenk. 64, 1-26 (1954).

STEWART, J.E. and R.E. KALLIO: Bacterial hydrocarbon oxidation. II. J. Bact. 78, 726-730 (1959b).

STEWART, J.E., R.E. KALLIO, D.P. STEVENSON, A.C. JONES and D.O. SCHISSLER: Bacterial hydrocarbon oxidation. I. J. Bact. 78, 441-448 (1959a).

THIJSSE, G.J.E. and A.C. VAN DER LINDEN: n-Alkanes oxidation by a Pseudomonas. Ant. v. Leeuwenh. 24, 298-308 (1958).

WATTENBERG, H.: Die Meerwasser-Trinkkur auf Grund wissenschaftlicher Untersuchungen und Beobachtungen. Zit. in F. Neumann: Die Meerwasser-Trinkkur, Westerland: 1939, S. 5.

WEBLEY, D.M.: The morphology of Nocardia opaca Waksman u. Henrici (Proactinomyces opacus Jensen) when grown on hydrocarbons, vegetable oils, fatty acids and related substances. J. gen. Microbiol. 11, 420-425 (1954).

WEBLEY, D.M., R.B. DUFF and V.C. FARMER: Beta-oxidation of fatty acids by Nocardia opaca. J. gen. Microbiol. 13, 361-369 (1955).

Evidence for ß-oxidation in the metabolism of saturated aliphatic hydrocarbons by soil species of Nocardia. Nature (London) 178, 1467-1468 (1956).

Formation of a ß-hydroxy acid as an intermediate in the microbiological conversion of monochlorophenoxybutyric acids to the corresponding substituted acetic acids. Nature (London) 179, 1130 (1957).

The influence of chemical structure on ß-oxidation by soil nocardias. J. gen. Microbiol. 18, 733-746 (1958).

Effect of substitution in the side-chain on ß-oxidation of aryloxy-alkylcarboxylic acids by Nocardia opaca. Nature (London) 183, 748-749 (1959).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Engel (Leiter der Abteilung für Mikrobiologie des Staatsinstitutes für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg) von März 1958 bis November 1960 in diesem Institut durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Engel, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die vielfache Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Mevius, Direktor des Staatsinstitutes für Allgemeine Botanik, sage ich meinen Dank für die Arbeitsmöglichkeiten.

LEBENSLAUF.

Geboren wurde ich am 27.1.1928 in Wandsbek (jetzt Hamburg) als drittes Kind des späteren Stadtamtsrates Arthur Seeler und seiner Ehefrau Dora, geb. Ahrndsen. Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich von 1938 bis zur Reifeprüfung im Jahre 1947 (mit kriegsbedingten Unterbrechungen) die Oberschule zu Hamburg-Volksdorf. Nach Abschluss der Landwirtschaftslehre auf Gut Wulksfelde (Holstein) begann ich 1950 das Studium der biologischen Wissenschaften an der Universität in Frankfurt a.M., das ich nach einjähriger Unterbrechung 1953 in Hamburg fortsetzte. An dieser Universität legte ich 1958 die Diplomhauptprüfung für Biologen ab. Im Jahre 1960 verheiratete ich mich und seit Anfang 1961 bin ich als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Chemischen Laboratorium der Universität in Freiburg / Brsg. tätig.

ROTA-DRUCK · Johannes Krause · BUCHBINDEREI
Freiburg i. Br. Katharinenstraße 1